

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-88

(P2000-88A)

(43)公開日 平成12年1月7日(2000.1.7)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード*(参考)
C 12 N	1/16	C 12 N	1/16
	1/14		B
	1/38		B
	9/80		1/38
C 12 P	21/00	C 12 P	9/80
		21/00	Z
			A
		審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 9 頁)	最終頁に続く

(21)出願番号	特願平11-68338	(71)出願人	000000066 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目15番1号
(22)出願日	平成11年3月15日(1999.3.15)	(72)発明者	湯浅 安理 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の 素株式会社食品総合研究所内
(31)優先権主張番号	特願平10-121621	(72)発明者	岡村 英喜 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の 素株式会社食品総合研究所内
(32)優先日	平成10年4月16日(1998.4.16)	(72)発明者	片岡 二郎 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の 素株式会社食品総合研究所内
(33)優先権主張国	日本 (JP)	(74)代理人	100074077 弁理士 久保田 藤郎 (外1名)

(54)【発明の名称】 グルタミナーゼ活性が増強された微生物培養物及びその利用

(57)【要約】

【課題】 グルタミナーゼ活性が増強された微生物培養物とその調製方法を提供すると共に、該微生物培養物を用いた蛋白質加水分解物の製造方法と該方法により得られる蛋白質加水分解物を提供すること。

【解決手段】 グルタミナーゼ産生能を有する微生物の培養中のカタボライトリプレッションを解除すること並びに必要により培養中期に窒素源を供給することを特徴とするグルタミナーゼ活性が増強された微生物培養物の調製方法；該方法で調製される微生物培養物；該微生物培養物を、蛋白質分解酵素の存在下、無塩もしくは食塩濃度3%（重量／容量）以下の条件下で蛋白質に作用させることを特徴とする蛋白質加水分解物の製造方法並びに該方法により製造される蛋白質加水分解物。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 グルタミナーゼ産生能を有する微生物の培養中のカタボライトリプレッショング解除すること並びに必要により培養中期に窒素源を供給することを特徴とするグルタミナーゼ活性が増強された微生物培養物の調製方法。

【請求項2】 カタボライトリプレッショングの解除を、培養中に炭素源を連続的又は間欠的に供給することにより行う請求項1記載の方法。

【請求項3】 グルタミナーゼ産生能を有する微生物が、麹菌又は酵母である請求項1記載の方法。

【請求項4】 請求項1記載の方法により調製されるグルタミナーゼ活性が増強された微生物培養物。

【請求項5】 請求項4記載のグルタミナーゼ活性が増強された微生物培養物を、蛋白質分解酵素の存在下、無塩もしくは食塩濃度3%（重量／容量）以下の条件下で蛋白質に作用させることを特徴とする蛋白質加水分解物の製造方法。

【請求項6】 微生物培養物を蛋白質に作用させる際に、当初通気及び攪拌を行いながら15～39℃の温度範囲で反応を行い、次いで通気を停止して40～60℃の温度範囲で反応を行うことを特徴とする請求項5記載の蛋白質加水分解物の製造方法。

【請求項7】 請求項5又は6記載の方法により製造される蛋白質加水分解物。

【請求項8】 下記の特徴を有する蛋白質加水分解物。
 (a) 小麦グルテンを原料とする。
 (b) 全固体分中のグルタミン酸含有量がグルタミン酸ナトリウムとして16～36（重量／重量）%である。
 (c) 全固体分中の全窒素含有量が8～13%（重量／重量）である。
 (d) 全固体分中の総アミノ酸含有量が40～72%（重量／重量）である。
 (e) 全固体分中の食塩含有量が14%（重量／重量）以下である。
 (f) 全固体分中の還元糖含有量が5%（重量／重量）以下である。
 (g) モノクロロヒドロキシプロパノール類及びジクロロプロパノール類を含まない。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、グルタミナーゼ活性が増強された微生物培養物の調製方法に関し、詳しくはグルタミナーゼ産生能を有する微生物の培養中のカタボライトリプレッショング解除すること並びに必要により培養中期に窒素源を補給することにより、グルタミナーゼ活性が増強された微生物培養物を調製する方法に関する。また、本発明は、グルタミナーゼ活性が増強された微生物培養物、該微生物培養物を用いた蛋白質加水分解物の製造方法及び該製造方法により得られる蛋白質

加水分解物に関する。この蛋白質加水分解物は、グルタミン酸含有量が高いために呈味力が強く、調味料としての利用価値が高い。

【0002】

【従来の技術】 グルタミナーゼは、生物界に広範に分布する酵素であり、L-グルタミンに作用し、アミド基を加水分解してL-グルタミン酸とアンモニアに分解する酵素である。L-グルタミン酸を水酸化ナトリウムまたは炭酸ナトリウムで中和することによって得られるL-グルタミン酸ナトリウムは、あらゆるうま味の基本物質である。この物質の最大の用途は調味料で、家庭用のみならず加工食品の製造になくてはならない添加物である。

【0003】 また、これまでに知られている天然調味料の製造は、蛋白質の分解を経て行われるもののが主流であった。天然調味料と称されるもののうち、分解型天然調味料には酸分解型と酵素分解型がある。酸分解型調味料には、大豆、小麦などの植物性蛋白質を原料として得られるHydrolyzed Vegetable Proteinとゼラチン、乳カゼインなどの動物性蛋白質を原料として得られるHydrolyzed Animal Proteinがあり、その主成分であるアミノ酸組成は原料により大きく異なり、呈味、甘味などに影響を及ぼす。例えば、脱脂大豆の塩酸分解法で得られる分解液は、分解率（フォルモール態窒素／総窒素）が70%以上、グルタミン酸遊離率（グルタミン酸／総窒素）が1.2と高く、うま味の点においては極めて優れている。

【0004】 しかしながら、一般に塩酸分解法により蛋白質加水分解物を得る場合、100℃で1～2日間という反応条件を要するが、このような高温で長時間の反応は、エネルギー消費量が大きい。さらに、酸による蛋白質の加水分解は簡便であるけれども、異臭の発生やアミノ酸の過剰分解、中和のために高塩分となる等の欠点がある。その上、近年、酸分解法では人体に有害なモノクロロプロパノールやジクロロプロパノール等のクロロヒドリンが生成することが指摘されており、食品素材として問題になりつつある。

【0005】 一方、酵素的にアミノ酸液を製造する方法は、古くから多々試みられており、複雑な基質をアミノ酸にまで分解するために複合酵素系を必要とし、通常その目的を達成するためにはアスペルギルス・オリーゼ（*Aspergillus oryzae*）を中心とする麹菌を用いている。この方法で製造されるアミノ酸液の代表的なものとしては醤油が挙げられる。醤油は、蛋白質原料を加熱処理し、これに麹菌を繁殖させた後、食塩水中にて発酵、熟成させることにより製造される。しかしながら、この方法も多大の労力と時間を要するにも関わらず、アミノ酸遊離率が低く、特に大豆蛋白質中に最も多量含有され、かつ呈味性に重要なグルタミン酸の遊離率が低いという欠点がある。

【0006】このように蛋白質の酵素分解により製造される調味料は、近年欧州を中心にその需要が増加しつつあるものの、モノクロロヒドロキシプロパノール類及びジクロロプロパノール類を含まず、塩酸分解に匹敵する旨味の強い調味料は存在しなかった。醤油製造においてグルタミン酸が不足する原因として、麹菌のグルタミナーゼ活性の不足が挙げられる。そこで、固体培養においてプロテアーゼ高活性株とグルタミナーゼ高活性株との細胞融合による高活性菌株の造成も行われている (S.Ushijima, T.Nakadai: Agric. Biol. Chem., 51(4), 1051 (1987); S.Ushijima, T.Nakadai, K.Uchida: Agric. Biol. Chem., 51(10), 2781 (1987); S.Ushijima, T.Nakadai, K.Uchida: 醤研, 17(3), 89 (1991), 特公平3-73271号公報、特公平3-68672号公報)。

【0007】また、多くの酵素系が、消費速度の速い炭素源によって、その酵素の生合成が阻害されるカタボライトリプレッションを受けることが知られている (Aunstrup, K et al: "Microbial Technology" Vol.1 (2nd edition), Academic Press, New York, 282 (1979))。アスペルギルス・ニジュラヌス (*Aspergillus nidulans*) ではプロリン代謝系酵素やアルコール利用系酵素での研究が、アスペルギルス・オリーゼではタカアミラーゼ遺伝子発現制御の研究が進んでおり、creA遺伝子産物であるcreA蛋白質が、様々な酵素の合成の負の調整を行っていることが知られている (塙越規弘: 化学と生物, 32(1), 48 (1994))。

【0008】しかしながら、アスペルギルス・ニジュラヌスにおいて、培養時の窒素源がアンモニウムの場合、グルタミナーゼの生産が抑制されるという報告のみで、麹菌や酵母のグルタミナーゼがカタボライトリプレッションを受けるという報告は無い。さらに、各菌株の液体培養におけるグルタミナーゼに関しては以下のようない報告があるのみである。アスペルギルス・オリーゼ及びアスペルギルス・ソーヤの液体培養におけるリン酸1カリウム添加による菌体内グルタミナーゼ生産量の向上 (山崎達雄、稻森和夫、内田一生: 醤研, 22(1), 13 (1996))、バチルス・リケニホルミス (*Bacillus licheniformis*) におけるグルタミンによるグルタミナーゼの誘導、グルコースによる阻害 (Cook, William R, Hoffman, Joshua H, Bernlohr, Robert W: J. Bacteriol., 148(1), 365 (1981))、ショードモナス・ボレオポリス (*Ps. eudomonas boreopolis*) におけるグルタミンによるグルタミナーゼの誘導 (Berezov, T.T, Khisamov, G.Z, Evseev, L.P, Zanin, V.A: Byull. Eksp. Biol. Med., 76(10), 54 (1973))、エシェリチア・コリ (*Escherichia coli*) におけるグルタミンによるグルタミナーゼ生産阻害 (Varriacchio, Frederick: Arch. Mikrobiol., 81(3), 234 (1972))、ショードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*) におけるクエン酸、コハク酸、 α -ケトグルタル酸添加によるグルタミナーゼ生産の減少 (Ni

kolaev, A.Ya, Sokolov, N.N, Mardashev, S.R: Biokhimiya, 36(3), 643 (1971)) などである。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】以上に説明したように、アスペルギルス属に属する微生物や酵母を含めた真菌類のグルタミナーゼ生産の向上法に関しては殆ど報告がない。従って、本発明の目的は、第1にグルタミナーゼ活性が増強された微生物培養物の調製方法を提供することであり、さらに該グルタミナーゼ活性が増強された微生物培養物、該微生物培養物を用いた蛋白質加水分解物の製造方法、該方法により得られる蛋白質加水分解物を提供することである。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討を重ねた結果、微生物の培養中のカタボライトリプレッションを解除し、かつ必要により培養中期に窒素源を供給することによりグルタミナーゼ生産が飛躍的に向上することを見出し、本発明を完成するに至った。

20 【0011】請求項1記載の本発明は、グルタミナーゼ產生能を有する微生物の培養中のカタボライトリプレッションを解除すること並びに必要により培養中期に窒素源を供給することを特徴とするグルタミナーゼ活性が増強された微生物培養物の調製方法である。請求項2記載の本発明は、カタボライトリプレッションの解除を、培養中に炭素源を連続的又は間欠的に供給することにより行う請求項1記載の方法である。請求項3記載の本発明は、グルタミナーゼ產生能を有する微生物が、麹菌又は酵母である請求項1記載の方法である。

30 【0012】請求項4記載の本発明は、請求項1記載の方法により調製されるグルタミナーゼ活性が増強された微生物培養物である。請求項5記載の本発明は、請求項4記載のグルタミナーゼ活性が増強された微生物培養物を、無塩もしくは食塩濃度3% (重量/容量%) 以下の条件で蛋白質に作用させることを特徴とする蛋白質加水分解物の製造方法である。請求項6記載の本発明は、微生物培養物を蛋白質に作用させる際に、当初通気及び攪拌を行いながら15~39℃の温度範囲で反応を行い、次いで通気を停止して40~60℃の温度範囲で反応を行うことを特徴とする請求項5記載の蛋白質加水分解物の製造方法である。

40 【0013】請求項7記載の本発明は、請求項5又は6記載の方法により製造される蛋白質加水分解物である。請求項8記載の本発明は、下記の特徴を有する蛋白質加水分解物である。

(a) 小麦グルテンを原料とする。

(b) 全固形分中のグルタミン酸含有量がグルタミン酸ナトリウムとして16~36 (重量/重量) %である。

(c) 全固形分中の全窒素含有量が8~13% (重量/重量) である。

(d) 全固体分中の総アミノ酸含有量が40～72%（重量／重量）である。

(e) 全固体分中の食塩含有量が14%（重量／重量）以下である。

(f) 全固体分中の還元糖含有量が5%（重量／重量）以下である。

(g) モノクロロヒドロキシプロパノール類及びジクロロプロパノール類を含まない。

【0014】

【発明の実施の形態】本発明に用いる微生物は、グルタミナーゼ産生能を有する微生物であり、例えば前記したような、麹菌や酵母の他に、バチルス属微生物、ショードモナス属微生物、エシェリチア属微生物などが挙げられる。これらの中では、麹菌が好適である。麹菌としては、アスペルギルス・オリーゼ、アスペルギルス・ソーヤ等で代表される黄麹菌が好ましい。また、酵母としては、ブレラ・デルキシーなどが用いられる。

【0015】本発明において使用する培地は、上記微生物が生育し得るものであればよく、一般的に炭素源、窒素源、補助因子などを含むものである。培地中の炭素源については、グルコース、マルトース、フラクトース、シュクロース等のような微生物による資化速度の速い炭素源の場合、これらによるカタボライトリプレッションを解除する目的から、培養中は低濃度に保つように供給する必要がある。具体的には、培養液中の炭素源濃度が、炭素源の供給を連続的に行う場合には、0.5%（重量／容量）以下、好ましくは0.2%（重量／容量）以下、間欠的に行う場合には、1.2%（重量／容量）以下、好ましくは0.5%（重量／容量）以下になるように供給すべきである。なお、グルコースはデンプンの加水分解物、シュクロースはモラセスのような形態であってもよい。一方、ラクトース、マンニトール、ソルボース等の微生物による資化速度が比較的遅い炭素源に関しては、培養初期から通常量供給してもカタボライトリプレッションが発生することはない。それ故、これらは培養初期に0.5～3.0%（重量／容量）、好ましくは1.0～2.0%（重量／容量）を培地中に添加する。上記の炭素源は単独で用いる他、2種以上を組み合わせて用いても良い。このようにして、微生物の培養中のカタボライトリプレッションを解除することによりグルタミナーゼ生産を向上させ、高収率でグルタミナーゼを製造することができる。

【0016】培地中の窒素源の好適な例としては、硝酸ナトリウム、亜硝酸ナトリウム、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム等の無機窒素源、カザミノ酸、ポリペプトン、バクトペプトン、大豆蛋白質、分離大豆蛋白質、脱脂大豆、カゼイン等の有機窒素源、L-グルタミン酸ナトリウム、L-アスパラギン酸ナトリウム、L-プロリン、L-アラニン、グリシン、L-グルタミン等のアミノ酸類が挙げられる。特に、培養中期にこのような窒

素源を供給することにより、グルタミナーゼ生産をさらに上昇させることができる。添加する窒素源の量は、0.1～2.0%（重量／容量）、好ましくは0.5～1.0%（重量／容量）である。上記の窒素源は単独で用いる他、2種以上を組み合わせて用いても良い。なお、アンモニウム及びグルタミンを窒素源として使用する場合、グルタミナーゼの生産が抑制されることがあるが、少量ずつ添加を行うことにより生産抑制を回避することができる。

10 【0017】さらに、補助因子としては、硫酸マグネシウム7水和物、リン酸水素2ナトリウム、リン酸水素1ナトリウム、リン酸水素1カリウム、リン酸水素2カリウム、肉エキス、塩化カリウム、コーンスティープリカーなどがあり、これらを適宜選択して使用する。これらの添加量について述べると、例えば硫酸マグネシウムを約0.5%（重量／容量）、リン酸水素1カリウムを約0.5%（重量／容量）用いることが最適である。

【0018】さらに、初発の培養条件は、通常の好気的培養条件でよく、pH 4.5～9.0、好ましくはpH

20 5.5～8.5、温度15～40℃、好ましくは25～35℃が適当である。また、攪拌数や通気量については、培養環境を好気的に保つことができる条件であればいかなる条件でも差し支えない。本発明の方法に従って微生物を培養することにより、グルタミナーゼ活性は通常の約2～3.2倍に向上し、高収率でグルタミナーゼを製造することができる。従って、本発明において「グルタミナーゼ活性が増強された」という表現は、該活性がグルコースを初発濃度で1.5%（重量／容量）含有する培地中で培養中に炭素源を供給することなく培養したときに得られる該活性の約2倍以上、好ましくは約5倍以上に増強されていることを意味する。また、麹菌などを用いて調味料を製造する場合、本発明の方法を適用することによって、培養液中のグルタミナーゼ生産量が向上し、高品質の製品を効率よく大量に製造することができる。

30 【0019】このようにして得られた高グルタミナーゼ活性を有する微生物培養物は、蛋白質分解酵素の存在下、蛋白質に作用させることにより、旨みの強い加水分解物を得ることができる。使用する蛋白質分解酵素としては、市販の酵素剤でよく、細胞壁分解酵素等他の酵素を含むものであっても構わない。また、精製した酵素も使用することができる。特に、グルタミナーゼ活性を増強させる微生物として麹菌を使用する場合、麹菌自らが蛋白質分解酵素を生産するため、培養物中にグルタミナーゼ活性と蛋白質分解酵素活性の両方が含まれており、蛋白質分解酵素を外から添加する必要は必ずしもない。

40 【0020】本発明の高グルタミナーゼ活性を有する微生物培養物を作成させる蛋白質としては、例えば大豆、小麦、小麦グルテン、コーンミール、ミルクカゼイン、

フィッシュミール等であり、更に脱脂大豆あるいは膨化や可溶化等の加工をされた種々の蛋白質、あるいはこれらの種々の蛋白原料からの分離蛋白質でもよい。特に、小麦グルテン等のグルタミンを多く含む蛋白質は、高グルタミナーゼ活性を有する微生物培養物を作成させるのに適している。また、高グルタミナーゼ活性を有する微生物培養物を蛋白質に作用させる条件について述べると、例えば0.2~50%、好ましくは1~20%の濃度の原料に高グルタミナーゼ活性を有する微生物培養物を蛋白質分解酵素存在下で混合し、5~60℃、好ましくは30~50℃にて、4時間~10日間、好ましくは10時間~5日間反応させればよい。なお、上記の蛋白原料には、澱粉等の炭水化物が含まれることがあり、反応中に加水分解されてグルコース等の還元糖が生成することがある。製造される蛋白加水分解物に還元糖が残存すると、褐変を起こす原因となるため、還元糖の量を反応生成物中の全固形分に対し5%（重量/重量）以下、好ましくは3%（重量/重量）以下、さらに好ましくは1.5%（重量/重量）以下に調整することが望ましい。具体的には、まず、通気及び攪拌を行いながら15~39℃、好ましくは25~38℃の温度範囲で反応を行い、還元糖を資化させた後、通気を停止して40~60℃、好ましくは41~50℃の温度範囲で反応を行ったのち反応を終了させることにより、反応生成物中の還元糖の量を低減することができる。反応温度を移行させる時点は、反応開始後、全反応時間の10~60%を経過した時点である。

【0021】蛋白質の加水分解反応は、無塩もしくは食塩濃度3%（重量/容量）以下の低塩条件下で行う。蛋白分解酵素及びグルタミナーゼは食塩により活性が阻害されることがあり、食塩濃度が低い方が反応速度が向上するので好ましい。但し、反応中、防腐の目的で少量のエタノール、食塩を添加してもよい。反応終了後、未反応の原料蛋白質、菌体などの不溶物は遠心分離や濾過等、従来の分離法を用いて除去すればよい。また、必要に応じて、固液分離後の液体区分を減圧濃縮、逆浸透法などにより濃縮してもよい。特に、pHをアルカリ性に調整した後、減圧下で濃縮を行うことにより、反応液中に含まれるアンモニア含量を低減することができる。本発明者らの知見によれば、グルタミン含量の高い小麦グルテンを原料として使用した場合、蛋白質加水分解物中のアンモニアが他原料由来のものと比べて多くなり、これが最終生産物の褐変を引き起こしている。従って、蛋白質加水分解物からアンモニア含量を低減するするが望ましい。アンモニア含量は、全固形分中のアンモニア態窒素量/全窒素量が0.35（重量/重量）以下、好ましくは0.15（重量/重量）以下となるようにすればよい。更に、濃縮物は凍結乾燥、減圧乾燥、噴霧乾燥等の乾燥処理により、粉末化又は顆粒化することができる。かくして外部からグルタミン酸ナトリウムを添加す

ることなく、グルタミン酸ナトリウム含有量が高く呈味性の強い蛋白質加水分解物を得ることができる。

【0022】上記のようにして得られる蛋白質加水分解物は、塩酸分解物とは異なり、モノクロロヒドロキシプロパノール類及びジクロロプロパノール類を含まない。これは、エキストレルーオカラムにより抽出し、フェニルホウ酸による誘導体をガスクロマトグラフィー質量分析法（GC-MS法）で検出する方法（牛島ら、食衛誌36,3,360-364,1995）によって検出限界以下であることにより確認することができる。なお、モノクロロヒドロキシプロパノール類には、3-chloro-1,2-propandiol、2-chloro-1,3-propandiol、ジクロロプロパノール類には、1,3-dichloro-2-propanol、2,3-dichloro-1-propanolがある。上記の方法によるこれらの物質の検出限界は、液体試料では0.005ppm、粉末試料では0.05ppmである。

【0023】本発明の蛋白質加水分解物を各種食品（小麦粉使用製品、即席食品類、農産・畜産・水産加工品、乳製品、油脂類、冷凍食品、基礎及び複合調味料、菓子類、嗜好飲料類、その他の食品）へ添加することにより、うま味の強化、甘味の強化、濃厚感・伸びの付与、まろやかさの付与、風味の増強、塩味・酸味の緩和、異風味のマスキング等の効果がある。特に、・醤油存在下での甘味、まろやかさ、濃厚感の付与、・肉製品の異風味のマスキング及び肉風味の増強、・ポーク、チキン、ビーフ、魚介、野菜エキス併用時の風味増強、・香辛料存在下での香辛料風味の増強及び辛味のエンハンスの効果が強い。本発明の蛋白質加水分解物は、風味が弱く、色が淡く、かつグルタミン酸ナトリウム含有量が高いので、食品のものとの風味を変えたり、色を強めることなく、上記の効果を高めたり、うま味の強化が可能である。また、核酸等の他のうま味成分や酵母エキス、蛋白質加水分解物との併用により、更にうま味・こく味の強い食品の製造が可能となる。

【0024】

【実施例】以下に実施例により本発明を詳細に説明する。しかし、これらの実施例は本発明を限定するものではない。なお、アスペルギルス・オリーゼ（ATCC 11494）は、American Type Culture Collection (12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852-1776, U.S.A.) 発行のカタログに、アスペルギルス・ソーヤ（JCM 2250）及びブレラ・デルキシー（JCM 5280）は、理化学研究所微生物系統保存施設（埼玉県和光市広沢2-1）発行のカタログにそれぞれ掲載されており、請求により分譲を受けることができる。

【0025】なお、実施例中におけるグルタミナーゼ活性の測定法は以下の通りである。グルタミナーゼ活性は、ヒドロキシルアミン存在下の酵素反応で生成するγ-グルタミルヒドロキサム酸を定量するハートマンらの

変法 (Hartman, S.C.: J. Biol. Chem., 243, 853-863(1968)) に従い測定した。具体的には、試薬 A (0.4 M トリスアミノメタン、0.2 M 塩酸ヒドロキシルアミン (pH 7.0)) と試薬 B (100 mM L-グルタミン、20 mM 還元グルタチオン (pH 7.0)) の等量混合液 1 mL に培養液 200 μL を加え、37°C で 1 時間インキュベートする。次に、反応停止及び発色のために、(1) 3 N 塩酸、(2) 12% トリクロロ酢酸及び(3) 5% 塩化第二鉄水和物を 0.1 N

塩酸溶液に溶解した溶液のそれぞれの等量混合液 1 mL を加えて攪拌し、この反応液上清の 525 nm での吸光度を測定して酵素活性を求めた。なお、上記条件下において 1 分間に 1 μg の γ-グルタミルヒドロキサム酸を生成させる酵素活性を 1 単位 (U) とした。

【0026】実施例 1 アスペルギルス・オリーゼを用いたグルタミナーゼ活性が増強された微生物培養物の製造

ラクトース又はグルコース 1.5%、ポリペプトン 1.5%、硫酸マグネシウム水和物 0.5%、塩化カリウム 0.25%、リン酸水素 1 ナトリウム 0.25% を含む培地 (pH 無調整) 2 L を総容量 5 L のジャーファーメンターに張り込み、オートクレーブ殺菌後、アスペルギルス・オリーゼ (ATCC 11494) を常法通り接種した。なお、この際に接種する麹菌の形態は任意であり、胞子であっても、菌糸であっても差し支えない。その後、温度 30°C、攪拌数 600 rpm、通気量 1/2 vvm にて 48 時間培養を行った。培養終了後、培養物のグルタミナーゼ活性を測定した。その結果、培養液のグルタミナーゼ生産量は、培地の炭素源が資化速度の速いグルコースの場合、0.057 (u/m1) であったが、資化速度の遅いラクトースの場合は、0.185 (u/m1) であり、グルコースを用いたときと比べて 3 倍以上のグルタミナーゼ生産量を示した。すなわち、資化速度の遅い炭素源であるラクトースを用いることにより、カタボライトリプレッショ�이解除され、生産量が向上したわけである。

【0027】さらに、炭素源としてラクトースを使用した場合、培養中期に L-グルタミン酸ナトリウム水和物 1.0% を添加して培養を継続することにより、グルタミナーゼ生産量は 0.401 (u/m1) に向上した。以上の結果から、ラクトースを炭素源として用い、かつ培養中期に窒素源である L-グルタミン酸ナトリウム水和物 1.0% を添加して培養を継続することにより、グルタミナーゼ生産量を約 7 倍に上昇させることができた。

【0028】実施例 2 アスペルギルス・オリーゼを用いたグルタミナーゼ活性が増強された微生物培養物の製造

マンニトール又はシュクロース 1.5%、ポリペプトン 1.5%、硫酸マグネシウム水和物 0.5%、塩化カリウム 0.25%、リン酸水素 1 ナトリウム 0.25% (pH 無調整) 又は培地 B (ポリペプトン 1.5%、硫酸マグネシウム水和物 0.5%、塩化カリウム 0.25%、リン酸水素 1 ナトリウム 0.25% (pH 無調整)) 2 L を総容量 5 L のジャーファーメンターに張り込み、オートクレーブ殺菌後、アスペルギルス・オリーゼ (JCM 2250) を常法通り接種した。なお、この際に接種する麹菌の形態は胞子であっても、菌糸であっても差し支えない。その後、温度 30°C、攪拌数 600 rpm、通気量 1/2 vvm にて 34 時間培養を行った。培地 B で発酵を開始するジャーファーメンターについては、グルコースを 0.2% 以下に保つべく連続添加するものと、同じくグルコースを 0.2% 以下に保つべく連続添加すると共に、培養中期である培養開始 17 時間目に窒素源である L-グルタミン酸ナトリウム水和物 1.0% を添加するものの合計 2 基のジャーファーメンターを用意した。

【0029】培養終了後、培養物のグルタミナーゼ活性を測定した。その結果、培地 A で培養した培養液のグルタミナーゼ生産量は 0.002 (u/m1)、培地 B で

リウム 0.25%、リン酸水素 1 ナトリウム 0.25% を含む培地 (pH 無調整) 2 L を総容量 5 L のジャーファーメンターに張り込み、オートクレーブ殺菌後、アスペルギルス・オリーゼ (ATCC 11494) を常法通り接種した。なお、この際に接種する麹菌の形態は任意であり、胞子であっても、菌糸であっても差し支えない。その後、温度 30°C、攪拌数 600 rpm、通気量 1/2 vvm にて 48 時間培養を行った。培養終了後、培養物のグルタミナーゼ活性を測定した。その結果、培養液のグルタミナーゼ生産量は、培地の炭素源が資化速度の速いシュクロースの場合、0.011 (u/m1) であったが、資化速度の遅いマンニトールの場合は、0.148 (u/m1) であり、シュクロースを用いたときと比べて 13 倍以上のグルタミナーゼ生産量を示した。すなわち、資化速度の遅い炭素源であるマンニトールを用いることにより、カタボライトリプレッショ�이解除され、生産量が向上したわけである。

【0030】さらに、炭素源としてマンニトールを使用した場合、培養中期に L-グルタミン酸ナトリウム水和物 1.0% を添加して培養を継続することにより、グルタミナーゼ生産量は 0.331 (u/m1) に向上した。以上の結果から、マンニトールを炭素源として用い、かつ培養中期に窒素源である L-グルタミン酸ナトリウム水和物 1.0% を添加して培養を継続することにより、グルタミナーゼ生産量を約 30 倍に上昇させることができた。

【0031】実施例 3 アスペルギルス・ソーヤを用いたグルタミナーゼ活性が増強された微生物培養物の製造
培地 A (グルコース 1.5%、ポリペプトン 1.5%、硫酸マグネシウム水和物 0.5%、塩化カリウム 0.25%、リン酸水素 1 ナトリウム 0.25% (pH 無調整)) 又は培地 B (ポリペプトン 1.5%、硫酸マグネシウム水和物 0.5%、塩化カリウム 0.25%、リン酸水素 1 ナトリウム 0.25% (pH 無調整)) 2 L を総容量 5 L のジャーファーメンターに張り込み、オートクレーブ殺菌後、アスペルギルス・ソーヤ (JCM 2250) を常法通り接種した。なお、この際に接種する麹菌の形態は胞子であっても、菌糸であっても差し支えない。その後、温度 30°C、攪拌数 600 rpm、通気量 1/2 vvm にて 34 時間培養を行った。培地 B で発酵を開始するジャーファーメンターについては、グルコースを 0.2% 以下に保つべく連続添加するものと、同じくグルコースを 0.2% 以下に保つべく連続添加すると共に、培養中期である培養開始 17 時間目に窒素源である L-グルタミン酸ナトリウム水和物 1.0% を添加するものの合計 2 基のジャーファーメンターを用意した。

【0032】培養終了後、培養物のグルタミナーゼ活性を測定した。その結果、培地 A で培養した培養液のグルタミナーゼ生産量は 0.002 (u/m1)、培地 B で

11

グルコースを0.2%以下に保つべく連続添加した培養液のグルタミナーゼ生産量は0.022(u/m1)、培地Bでグルコースを0.2%以下に保つべく連続添加し、培養17時間目にL-グルタミン酸ナトリウム1水和物1.0%を添加して培養した培養液のグルタミナーゼ生産量は0.064(u/m1)を示した。以上の結果から、資化速度の速いグルコースを培養開始時から高濃度に添加して培養を行った場合のグルタミナーゼ生産量に比べ、グルコースを低濃度で連続添加し、カタボライトリプレッションを解除したものは、グルタミナーゼ生産量が約1.1倍向上した。さらに培養中期にL-グルタミン酸ナトリウム1水和物を添加して培養することにより、麹菌のグルタミナーゼ生産量は3.2倍に向上することがわかった。

【0032】実施例4 酵母を用いたグルタミナーゼ活性が増強された微生物培養物の製造法

培地A(グルコース1.5%、バクトペプトン0.5%、麦芽エキス0.3%、酵母エキス0.3%(pH無調整))又は培地B(バクトペプトン0.5%、麦芽エキス0.3%、酵母エキス0.3%(pH無調整))2Lを総容量5Lのジャーファーメンターに張り込み、オートクレーブ殺菌後、ブレラ・デルキー(JCM 5280)を常法通り接種した。その後、温度25℃、攪拌数800rpm、通気量1/2vvmにて5.5時間培養を行った。培地Bにて発酵を開始するジャーファーメンターは、グルコースを0.05%以下に保つべく連続添加するものと、同じくグルコースを0.05%以下に保つべく連続添加すると共に、培養中期の培養24時間目に窒素源であるL-グルタミン酸ナトリウム1水和物1.0%を添加するジャーファーメンターの2基を用意した。

【0033】培養終了後、培養物のグルタミナーゼ活性を測定した。その結果、培地Aで培養した培養液のグルタミナーゼ生産量は0.121(u/m1)、培地Bでグルコースを連続添加した培養液のグルタミナーゼ生産量は0.486(u/m1)を示した。以上のことから、資化速度の速いグルコースを培養開始時から高濃度に添加して培養を行った際のグルタミナーゼ生産量に比べ、カタボライトリプレッションを解除すべくグルコースを低濃度で連続添加したものはグルタミナーゼ生産量が2.1倍向上した。さらに培養中期にL-グルタミン酸ナトリウム1水和物を供給することにより、グルタミナーゼ生産量は4倍に向上することがわかった。

12

*量は0.252(u/m1)、培地Bでグルコースを連続添加し、培養24時間目にL-グルタミン酸ナトリウム1水和物1.0%添加して培養した培養液のグルタミナーゼ生産量は0.486(u/m1)を示した。以上のことから、資化速度の速いグルコースを培養開始時から高濃度に添加して培養を行った際のグルタミナーゼ生産量に比べ、カタボライトリプレッションを解除すべくグルコースを低濃度で連続添加したものはグルタミナーゼ生産量が2.1倍向上した。さらに培養中期にL-グルタミン酸ナトリウム1水和物を供給することにより、グルタミナーゼ生産量は4倍に向上することがわかった。

【0034】実施例5

以下の操作は無菌的に行った。オートクレーブ処理した5%小麦グルテン(商品名:アジプロンG2:味の素(株)製)溶液20m1に、実施例2記載のマンニトールを炭素源としたアスペルギルス・オリーゼ(ATCC 11494)の培養物10m1を混合し、40℃で10時間、24時間、4日間、10日間反応させた。また、実施例1記載のシューカロースを炭素源としたときのアスペルギルス・オリーゼの培養物10m1を用いたものを比較対照として同様に実施した。これらの反応物の上清について全窒素量(T-N)、遊離グルタミン酸量の測定を行った。グルタミン酸含量は酵素法により、また全窒素量はケルダール法により求めた。これらの分析値及びグルタミン酸量と全窒素量から求めたグルタミン酸遊離率(グルタミン酸量/全窒素量)を第1表に示す。第1表に示した通り、マンニトールを炭素源としたときのアスペルギルス・オリーゼの培養物を用いた小麦グルテン分解液のグルタミン酸遊離率は、シューカロースを炭素源としたときよりも明らかに高い値であった。また、それらの分解液は強い呈味を有していた。

【0035】

【表1】第1表 小麦グルテン分解液のグルタミン酸遊離率比較

培地 炭素源	反応時間	グルタミン酸量 (g/dl)	全窒素量 (g/dl)	グルタミン酸遊離率
シューカロース	10時間	0.10	0.46	0.22
	24時間	0.14	0.46	0.32
	4日	0.23	0.47	0.48
	10日	0.42	0.47	0.89
マンニトール	10時間	0.54	0.46	1.18
	24時間	0.65	0.46	1.41
	4日	0.80	0.47	1.70
	10日	0.87	0.47	1.85

【0036】実施例6

以下の培養、分解反応は無菌的に行った。分離大豆蛋白

(商品名:アジプロンE3、味の素(株)製)1.5%

、硫酸マグネシウム7水和物0.5%、塩化カリウム

13

0. 25%及びリン酸水素ナトリウム0. 25%を含む培地(pH無調整)2Lを総容量5Lのジャーファーメンターに張り込み、オートクレーブ殺菌し、アスペルギルス・オリーゼ(ATCC 11494)を常法通り接種した。培養は、温度30°C、攪拌数600r.p.m.、通気量1/2vvmにて行った。培養中、グルコース溶液を全添加量が1.5% (重量/容量)となるように、また培養液中のグルコース濃度が0.5%を超えないよう間に欠的に4回に分けて供給した。また、培養中期にはL-グルタミン酸ナトリウム0.5%を添加して培養を継続し、48時間で培養を終了した。この培養物1Lと5%小麦グルテン(商品名:アジプロンG2、味の素(株)製)分散液2Lをオートクレーブ殺菌したもの混合し、小型ジャーファーメンターで通気攪拌を行いながら、35°Cで8時間反応させたのち、通気を停止し、45°Cで16時間分解反応を行った。この分解液をヌッヂュを用いて固液分離した後、濾液のアンモニア濃度と等モル量の水酸化ナトリウムを添加してエバボレーターで濃縮し、アンモニアを除去した。濃縮液に塩酸を添加してpH7.0とし、80°Cで20分間加熱殺菌を行った。冷却後、ヌッヂュを用いて濾引きし、ディスク式のスプレードライヤーを用いて噴霧乾燥し、噴霧乾燥品を得た。噴霧乾燥品の全窒素量、アンモニア態窒素量、食塩含量、遊離アミノ酸量及び還元糖量を測定した。食塩含量は塩化物含量より算出し、遊離アミノ酸量はアミノ酸分析により測定した。また、還元糖はレーマンショール法によりグルコース換算値として求めた。これらの分析値を第2表、第3表に示す。第3表に示した通り、グルタミナーゼ活性の高いアスペルギルス・オリーゼの培養物を用いて小麦グルテンを加水分解することにより、噴霧乾燥品としてグルタミン酸(グルタミン酸ナトリウムとして)を29.9% (重量/重量)、全窒素量を*

14

* 9.1% (重量/重量)、総アミノ酸量を55.4% (重量/重量)含む呈味力の強い蛋白質加水分解物を製造することができた。

【0037】

【表2】第2表 噴霧乾燥品のアミノ酸遊離量と遊離率

アミノ酸	遊離量 (g/100g)	遊離率 (g/gN)
Asp	2.46	0.27
Thr	1.72	0.19
Ser	2.74	0.30
Glu	23.56	2.56
Pro	5.14	0.56
Gly	2.05	0.23
Ala	2.01	0.22
Cys	0.39	0.04
Val	2.62	0.29
Met	0.87	0.10
Ile	2.38	0.26
Leu	4.39	0.48
Tyr	0.62	0.07
Phe	2.02	0.22
Lys	1.26	0.14
His	1.03	0.11
Arg	0.17	0.02
合計	55.44	6.09

【0038】

【表3】第3表 噴霧乾燥品の分析値

分析項目	含有量 (g/100g)	窒素当たりの含有量 (g/gN)
グルタミン酸*	29.9	2.59
全窒素量	9.12	1.00
全アミノ酸遊離量	55.4	6.09
食塩	4.37	0.48
アモニア態窒素	0.48	0.053
還元糖	1.33	0.149

* グルタミン酸ナトリウムとして

【0039】

【発明の効果】本発明により、グルタミナーゼ活性が増強された微生物培養物が提供される。この微生物培養物

を用いることによって、蛋白質加水分解物を効率よく製造することができる。得られた蛋白質加水分解物は、グルタミン酸含有量が高いため、呈味力が強く、調味料としての利用価値が高い。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷ 識別記号 F I フ-マコ-ド (参考)
//(C 1 2 N 9/80
C 1 2 R 1:69)
(C 1 2 N 9/80
C 1 2 R 1:66)